Reagena PUUMALA IgG EIA	Mode d'emploi	REAGENA	Fabricant : **Reagena International Oy Ltd** **Takojantie 18, 70900 Toivala, FINLANDE** **www.reagena.fi, info@reagena.fi**	IVD CE
REF 114301	**Version 1.8 FRE**			

Reagena PUUMALA IgG EIA

Reagena PUUMALA IgG EIA est une épreuve immunoenzymatique de détection des anticorps IgG du virus Puumala dans le sérum humain. Reagena PUUMALA IgG EIA est exclusivement destiné à l'usage professionnel.

Le virus Puumala, qui appartient à la famille des hantavirus, se trouve dans la plupart des pays européens. Ce virus est un agent responsable de la néphropathie épidémique (NE) et se transmet aux humains par inhalation ou contact direct avec les excréments du campagnol. La NE n'est que rarement fatale chez les individus en bonne santé mais elle peut entraîner une hospitalisation de longue durée. Le taux de mortalité de la NE est de 0,1 - 0,3 % parmi les patients infectés. Une infection créer une immunité à vie contre la NE.

PRINCIPE DU TEST

Avec le Reagena PUUMALA IgG EIA, la protéine recombinante de la nucléocapside du virus Puumala est immobilisée sur une plaque de microtitration. L'antigène capture les anticorps spécifiques aux virus Puumala présents dans l'échantillon. Les anticorps IgG capturés sont détectés par enzyme RP et le développement de la coloration est assuré par un substrat de TMB. Le temps d'incubation total est de 2 heures et demie et le kit permet d'effectuer 40 analyses en double.

CONTENU DU KIT

1 cadre EIA
3x4 bâtonnets diagnostiques (8-barrettes de microtitration)
Tampon de concentré de lavage x 2
Tampon pour dilution
Contrôle, négatif
Contrôle, positif
Conjugué HRP
Substrat TMB
Solution d'arrêt
Mode d'emploi

MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON INCLUS DANS LE KIT

Pipettes de précision et embouts de pipette, 5-100 µl
Pipette ou dispositif de lavage de la plaque 250 µl / microcupule
Tubes d'échantillonnage 1 - 5 ml
Une fiole de 0,5 ou 1 L
Ruban d'étanchéité EIA
Lecteur de microplaque EIA à longueur d'onde de 450 nm
Agitateur de plaque à microcupules

CONSERVATION

Conserver le kit entre +4 et 8 °C. Le kit reste stable jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette. Voir le tableau page 2 pour les informations concernant la conservation et la stabilité du kit.

ÉCHANTILLONS

Il est conseillé d'utiliser des échantillons frais (plutôt que congelés). Les échantillons congelés peuvent entraîner des faux positifs lorsque les résultats sont agrégés. Si l'échantillon est agrégé ou de mauvaise qualité, veuillez centrifuger les échantillons pendant 5 minutes à 3000 x g avant de les utiliser.

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

- Ne pas mélanger de composants issus de lots différents.
- Ne pas utiliser de bâtonnets diagnostiques si l'emballage en aluminium qui les contient est endommagé.
- Ne pas mélanger les échantillons à tester puisque différentes matrices pourraient entraîner une mauvaise reproductibilité.
- Toute infection bactérienne ou fongique des tampons ou réactifs pourra entraîner des résultats erronés. Jeter tout réactif qui aurait l'air trouble lorsque vous l'inspectez à la lumière.

AVERTISSEMENT

- Les contrôles comprennent du sérum humain testé et trouvé négatif en VIH, HTLV, hépatite B et C. Veuillez manipuler les contrôles comme des substances potentiellement infectantes.
- Jetez les contrôles, échantillons et matériels conformément aux réglementations locales et fédérales vous concernant.
- La solution d'arrêt Reagena EIA contient < 1% m/V d'acide sulfurique. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.
- Le substrat TMB Reagena EIA contient du 3,3,5,5-tétraméthylbenzidine < 0,05% w/w. La concentration est si basse qu'elle n'affecte pas la classification du produit.

PROCÉDURE DE TEST

Lire attentivement le mode d'emploi avant de commencer les tests. Contacter le fabricant ou votre fournisseur en cas de questions supplémentaires concernant le produit. Effectuer le test entre +15 et 25 °C. Conserver le kit au réfrigérateur (entre +4 et 8 °C) pendant les périodes d'incubation.

1. Ouvrir le kit et vérifier qu'il contienne tous les composants figurant sur l'étiquette du couvercle.
2. Diluer les échantillons à 1:201 avec le tampon de dilution (c-à-d 5 µl d'échantillon + 1000 µl de tampon de dilution).
3. Diluer le tampon de concentré de lavage à 1:10 avec de l'eau désionisée (c-à-d 50 ml de tampon de concentré de lavage + 450 ml d'eau). Bien mélanger.
4. Dissoudre le contrôle positif et le contrôle négatif avec 1,3 ml de tampon de dilution et bien mélanger.
5. Prendre le nombre requis de bâtonnets diagnostiques EIA de leur emballage en aluminium et les placer sur le cadre EIA. Si tous les bâtonnets ne sont pas utilisés, refermer immédiatement l'emballage en aluminium et conserver les bâtonnets restants entre +4 et 8 °C.
6. Laver les microcupules EIA une fois avec le tampon de lavage (250 µl / microcupule). Vider les microcupules et les humidifier avec du papier mouchoir.
7. Transférer en double les dilutions d'échantillons, de contrôles positifs et négatifs sur la plaque (100 µl / microcupule).
8. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
9. Diluer le conjugué HRP à 1:10 avec le tampon de dilution (pour un bâtonnet diagnostique : 100 µl de conjugué HRP + 900 µl de tampon de dilution) et bien mélanger.
10. Laver quatre fois les cupules avec le tampon de lavage (250 µl/ microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
11. Transférer le conjugué de RP dilué avec la pipette sur la plaque (100 µl / microcupule).
12. Incuber pendant 60 minutes à température ambiante dans un agitateur orbital (~450 rpm).
13. Laver cinq fois les microcupules avec le tampon de lavage (250 µl/ microcupule) et les sécher avec du papier mouchoir.
14. Ajouter le substrat de TMB (rose) à la plaque (100 µl / cupule).
15. Incuber pendant 30 minutes à température ambiante et *à l'abri de la lumière*.
16. Ajouter la solution d'arrêt (100 µl / microcupule) et bien mélanger jusqu'à ce que la couleur change

complètement (~15 secondes, 600-800 rpm; soit avec un agitateur orbital soit avec le lecteur EIA).

17. Mesurer les résultats dans les 10 minutes avec le lecteur EIA à 450 nm.

CALCUL DES RÉSULTATS

Calculer les résultats comme suit : **R= (Échantillon$_A$ / Contrôle positif$_A$) x K**

R= résultat

Échantillon $_A$ = Absorbance médiane de l'échantillon

Contrôle positif $_A$ = Absorbance du contrôle positif

K = valeur fonction du lot qui figure dans la fiche de données de contrôle comprise dans le kit. Utilisez cette valeur pour calculer les résultats finaux.

Le résultat final est obtenu comme suit : **NÉGATIF : R < 0,8**
ZONE GRISE : 0,8 ≤ R ≤ 1,2
POSITIF : R > 1,2

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Un résultat **négatif** signifie que l'échantillon ne contient pas d'anticorps IgG au virus Puumala. Le patient n'a par conséquent pas récemment contracté l'infection au virus Puumala et ne possède pas non plus d'immunité contre celui-ci. Dans l'éventualité où une infection aiguë serait soupçonnée, il est conseillé de tester les anticorps IgM du virus Puumala.

Lorsqu'un échantillon s'avère **positif**, il indique que l'échantillon du patient contient les anticorps IgG au virus Puumala. Le patient est par conséquent soit infecté par le virus Puumala soit protégé contre celui-ci. Un facteur de résistance ou d'autres infections n'entraînent pas un résultat positif de cette épreuve.

Les résultats situés en **Zone grise** signifient que le résultat ne s'avère ni positif ni négatif. Dans ce cas, suivre les consignes de votre organisation. Il faudra généralement effectuer un nouveau test sur un nouvel échantillon quelques jours plus tard.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Vérifier que l'absorbance médiane du contrôle négatif et positif réponde aux critères figurant sur la fiche de données de contrôle. Veuillez noter que les valeurs des contrôles positifs et négatifs peuvent varier de lot à lot.

La variation d'absorbance de chaque paire d'échantillon et de contrôle doit être inférieure à 10%. Si le contrôle positif est utilisé dans différentes positions sur la plaque, la variation d'absorbance doit être inférieure à 20 %.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

Sensibilité et spécificité :

La sensibilité de 96 % et la spécificité de 97 % ont été obtenues lorsque REAGENA PUUMALA IgG EIA a été comparé à la méthode de référence (IFA et ELISA, Institut de microbiologie et d'immunologie de Ljubjana, Slovénie), en utilisant les échantillons sériques positifs de 110 patients et négatifs de 95 patients.

Imprécision :

Intra épreuve		
Sérum positif	Absorbance médiane de1,067	4,6 CV%, n=48
Sérum négatif	Absorbance médiane de 0,077	7,5 CV%, n=48
Inter épreuve		
Sérum positif	Absorbance médiane de 1,014	7,4 CV%, n=5
Sérum négatif	Absorbance médiane de 0,076	7,0 CV%, n=5

INFORMATIONS CONCERNANT LES COMPOSANTS DU KIT

Composant	Code	Information	Consignes d'utilisation	Conservation & stabilité
Bâtonnets diagnostiques	114301t	Plaque de microtitration munie d'un revêtement de protéines de la nucléocapside du virus Puumala.	Lavez les bâtonnets avec le tampon de lavage juste avant utilisation.	Non ouvert, dans l'emballage en aluminium entre +4 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon pour dilution	114x01v5	Tampon tris. Précoloré (rose) 65 ml.	Prêt à l'emploi	Entre + 4 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, positif	114301v1	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Contrôle, négatif	114x01v7	Sérum lyophilisé. Testé négatif en HIV, HTLV, hépatite B et C.	Dissoudre le contrôle dans 1,3 ml de tampon de dilution avant utilisation.	Dissous à -20 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Tampon de lavage concentré	114x01v6	Tampon tris. 2 x 50 ml	Diluer à 1:10 avec de l'eau désionisée juste avant utilisation.	Entre + 4 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Conjugué HRP	114301v2	Anticorps anti-IgG humaines conjugué à la peroxydase de raifort. 1,5 ml	Diluer à 1:10 avec le tampon de dilution juste avant utilisation.	A l'abri de la lumière et entre +4 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Substrat TMB	114x01v3	3,3',5,5'-Tétraméthyl-benzidine. Précoloré (rose). 12 ml	Prêt à l'emploi	A l'abri de la lumière et entre +4 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.
Solution d'arrêt	114x01v4	0,1 M d'acide sulfurique. 12 ml	Prêt à l'emploi	Entre + 4 et 8 °C jusqu'à la date d'expiration figurant sur l'étiquette.

LITTÉRATURE

Kallio-Kokko H, Vapalahti O, Lundkvist Å, Vaheri A. Evaluation of Puumala virus IgG and IgM enzyme immunoassays based on recombinant baculovirus-expressed nucleocapsid protein for early nephropatiaepidemica diagnosis. Clin Diagn Virol. 1998 May 1;10(1):83-90

Rev. 2011-05-15